

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-002683

(43)Date of publication of application : 07.01.2000

(51)Int.Cl.

G01N 27/327

(21)Application number : 10-168692

(71)Applicant : NEC CORP

(22)Date of filing : 16.06.1998

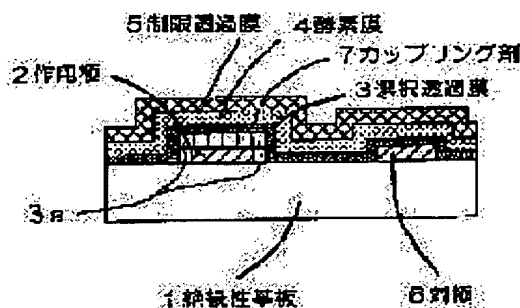
(72)Inventor : SAITO SOICHI  
SAITO ATSUSHI

## (54) BIOSENSOR

## (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a biosensor which can reproduce the sensor output by laminating a permselective membrane which covers the surface of a working electrode on a substrate on an enzyme membrane which is bonded to the surface of the substrate via a coupling agent and in which the working electrode is brought into close contact with the permselective membrane.

**SOLUTION:** Electrodes which are composed of a working electrode 2 and a counter electrode 6 are formed on an insulating substrate 1 so as to be separated at a set distance, and a permselective membrane 3 is formed on the working electrode 2. The permselective membrane 3 completely covers the surface of the working electrode 2 by using a space part 3a. An enzyme membrane 4 is bonded to the whole face of the substrate 1 via a coupling agent 7, and the working electrode 2 is brought into close contact with the permselective membrane 3. A restrictive permeation membrane 5 is formed on the enzyme membrane 4. A glass substrate, a ceramic substrate or the like is used for the substrate 1, and a cellulose acetate permselective membrane, an ion-exchange resin permselective membrane or the like is used for the permselective membrane 3. The enzyme membrane 4 is formed in such a way that the aqueous solution of a mixture of a protein, an enzyme and a cross-linking agent is applied on the coupling agent 7. In this manner, the enzyme membrane 4 is bonded to the whole face of the substrate 1, and the enzyme membrane 4 is brought into close contact with the permselective membrane 3. As a result, both membrane 4, 3 are not stripped from each other.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 16.06.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 01.08.2000

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-2683 ✓

(P2000-2683A)

(43)公開日 平成12年1月7日(2000.1.7)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 27/327

識別記号

F I

G 0 1 N 27/30

テマコード\*(参考)

3 5 3 B

3 5 3 J

審査請求 有 請求項の数7 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平10-168692

(22)出願日 平成10年6月16日(1998.6.16)

(71)出願人 000004237

日本電気株式会社

東京都港区芝五丁目7番1号

(72)発明者 齋藤 総一

東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社

(72)発明者 齋藤 敦

東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社

(74)代理人 100075306

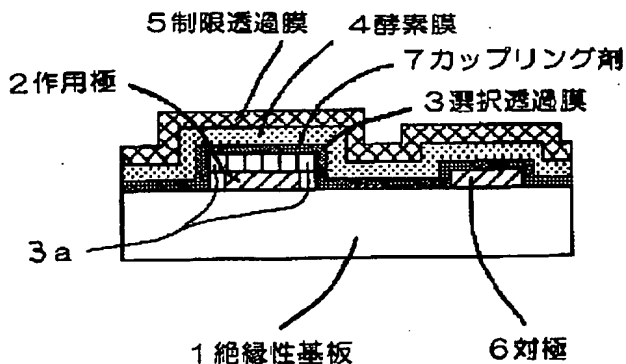
弁理士 菅野 中

(54)【発明の名称】 バイオセンサ

(57)【要約】

【課題】 溶液中で選択透過膜の密着性を確保したバイオセンサを提供することにある。

【解決手段】 選択透過膜3は、作用極2の表面のみを被覆する形状にパターン形成しており、酵素膜4は、カップリング剤7を介して基板1の表面に接合し、作用極2と選択透過膜3を密着させている。これにより、作用極2と選択透過膜3とが密着して安定に保持されることとなる。



## 1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも作用極と対極を基板上に有し、前記電極上に選択透過膜及び酵素膜を順次積層したバイオセンサであって、

前記選択透過膜は、前記作用極の少なくとも表面を被覆するものであり、

前記酵素膜は、カップリング剤を介して前記基板の表面に接合し、前記作用極と前記選択透過膜を密着させるものであることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項2】 前記選択透過膜は、前記作用極の表面及び側面を被覆するものであることを特徴とする請求項1に記載のバイオセンサ。

【請求項3】 前記選択透過膜は、前記作用極の表面を完全に覆うため該作用極の表面外形形状より若干大きめにパターン形成されたものであることを特徴とする請求項1又は2に記載のバイオセンサ。

【請求項4】 前記選択透過膜は、酢酸セルロースであることを特徴とする請求項1に記載のバイオセンサ。

【請求項5】 前記酵素膜は、グルタルアルデヒドを含有するものであることを特徴とする請求項1に記載のバイオセンサ。

【請求項6】 前記カップリング剤は、シランカップリング剤であることを特徴とする請求項1に記載のバイオセンサ。

【請求項7】 前記基板は、Si、SiO<sub>2</sub>またはAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>を主成分とするものであることを特徴とするバイオセンサ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、液中の成分濃度を測定するバイオセンサに関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】医療においては血液や尿、食料品においては果汁その他の液体の成分を定量的に把握することは、診断の精度、生産の効率向上のために極めて重要であり、近年、これらを測定するバイオセンサが開発されている。この種のバイオセンサを図4に示す。

【0003】図4に示される従来例に係るバイオセンサ（特開平9-21779号公報参照）は、セラミック製の基板1上に白金の作用極2が形成され、作用極2上に酢酸セルロースからなる選択透過膜3と、アルブミン、グルコースオキシターゼ、グルタルアルデヒドからなる酵素膜4、アルブミン、グルタルアルデヒドからなる制限透過膜5が順に積層形成されている。

【0004】図4に示される従来例の係るバイオセンサは、酢酸セルロースからなる選択透過膜3の密着性を向上させるために、基板1および作用極2上にN-メチルシラザンを用いてシロキサン基を導入していた。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】ところで、図4に示さ

## 2

れる従来例に係るバイオセンサでは、酢酸セルロースが共有結合に関与する感応基をもたないことに着目して、基板表面の極性を強めて密着性の向上を図る技術であると考えられる。

【0006】したがって、図4に示される従来例に係るバイオセンサは、乾燥状態では相応の効果を発揮することができるが、実際に測定を行う水溶液中では、ほとんど効果が得られないという問題がある。

【0007】また、特開平3-28752号公報に開示された技術では、ポリアリルアミン、アルブミン、グルタルアルデヒドからなる選択透過膜の密着性を向上させるために保湿剤としてコラーゲンを含有させ、これによって、選択透過膜の乾燥による収縮で膜が剥離することを防止している。

【0008】しかしながら、特開平3-28752号公報に開示された技術では、膜形成時の剥離を防止する効果を発揮するが、水溶液中での密着性を向上させる効果が全くなかった。

【0009】以上述べたように、従来例の技術では、水溶液中で選択透過膜の密着性を確保することができないという問題がある。

【0010】本発明の目的は、水溶液中で選択透過膜の密着性を確保したバイオセンサを提供することにある。

## 【0011】

【課題を解決するための手段】前記目的を達成するため、本発明に係るバイオセンサは、少なくとも作用極と対極を基板上に有し、前記電極上に選択透過膜及び酵素膜を順次積層したバイオセンサであって、前記選択透過膜は、前記作用極の少なくとも表面を被覆するものであり、前記酵素膜は、カップリング剤を介して前記基板の表面に接合し、前記作用極と前記選択透過膜を密着させるものである。

【0012】また前記選択透過膜は、前記作用極の表面及び側面を被覆するものである。

【0013】また前記選択透過膜は、前記作用極の表面を完全に覆うため該作用極の表面外形形状より若干大きめにパターン形成されたものである。

【0014】また前記選択透過膜は、酢酸セルロースである。

【0015】また前記酵素膜は、グルタルアルデヒドを含有するものである。

【0016】また前記カップリング剤は、シランカップリング剤である。

【0017】また前記基板は、Si、SiO<sub>2</sub>またはAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>を主成分とするものである。

## 【0018】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態を図により説明する。

【0019】図1は、本発明の一実施形態に係るバイオセンサを示す断面図である。

## 3

【0020】図1に示す本発明の実施形態1に係るバイオセンサは、電流検出型のバイオセンサである。

【0021】図1に示すような電流検出型のバイオセンサは、一般に絶縁基板1上に作用極2と対極6を形成し、電極2上に固定化酵素膜（酵素膜）4を設けており、その動作原理は下記の通りである。

【0022】すなわち、バイオセンサは、その感応部を溶液に接触させ、溶液に対し所定の電位差を印加して用いられる。

【0023】酵素は溶液に接触すると、溶液中の特定物質を電極（作用極2）で酸化還元可能な別の物質に変換し、変換された物質は、作用極2上で酸化あるいは還元される。

【0024】このとき作用極2と対極6の間には、その酸化還元反応に比例した電流が流れるため、この電流を測定すれば、溶液中の特定物質濃度を定量することが可能となる。

【0025】しかしながら、電極2、6は、液中に含まれる測定対象外の物質とも反応してしまう場合がある。このような物質を妨害物質と呼ぶ。これを除去するために設けられるのが、選択透過膜3あるいは妨害物質除去膜と呼ばれるものである。

【0026】選択透過膜3は、分子量あるいは荷電によって分子をふるいにかけるフィルターであり、一般的には多孔性の高分子である。例えば、もっとも広く普及しているグルコースセンサにおいては、主たる妨害物質は、アスコルビン酸（ビタミンC）であり、これを除去する選択透過膜としては、酢酸セルロースがよく用いられる。この他にイオン交換樹脂などが用いられることもある。

【0027】選択透過膜3は、溶液中の基質と反応して変化したり、汚染物質を吸着することがないよう化学的に安定でなければならない。このため、選択透過膜3と電極2、6及び基板1との密着性は、一般的にきわめて悪い。

【0028】そして、電極2、6から選択透過膜3が剥離すると、電極2、6に到達する基質の量が変わるため、バイオセンサの出力が不安定になる。

【0029】そこで、本発明は、酵素膜4をカップリング剤7を介して基板1の表面に接合し、基板1に接合した酵素膜4で作用極2と選択透過膜3を密着させることを特徴とするものである。

【0030】次に、本発明の具体例を実施形態1として詳細に説明する。

【0031】図1に示す本発明の実施形態1に係るバイオセンサは、絶縁性基板1上に作用極（測定極）2と対極6からなる電極を一定距離を離して形成し、作用極2上に選択透過膜3を形成している。

【0032】選択透過膜3は、作用極2の表面を完全に覆うため作用極2の表面外形形状より若干大きめに余白

## 4

部3aをもつ寸法にパターン形成されている。

【0033】図1に示す本発明の実施形態1では、選択透過膜3の機能が測定対象の物質を作用極2に透過接触するものであり、この機能を発揮すれば十分なるものであることに着目して、パターン形成された選択透過膜3を用いて作用極2の表面のみを被覆している。

【0034】なお、図1に示す選択透過膜3は、作用極2の表面のみを被覆しているため、その余白部3aが作用極2より離れているが、余白部3aを用いて作用極2の側面をも被覆し、作用極2の表面を完全に覆うようにしてもよい。

【0035】さらに、酵素膜4は、カップリング剤7を介して基板1の全面に接合し、基板1に接合した酵素膜4により作用極2と選択透過膜3を密着させている。

【0036】またカップリング剤7は、作用極2及び選択透過膜3を覆って基板1の全面に接合するようになっており、酵素膜4を基板1の全面に接合して、作用極2と選択透過膜3を密着させる締結力を酵素膜4に付与するようにしている。

【0037】また酵素膜4上には、制限透過膜5を形成している。また、電極2、6に追加して基準電位を設定する参照電極を設けることにより、バイオセンサの測定精度を向上させることが可能となる。

【0038】基板1にはガラスやセラミックが用いられ、電極2、6には、白金、カーボンが用いられる。参照電極には銀塩化銀電極、白金、金などが用いられる場合が多い。

【0039】選択透過膜3としては、酢酸セルロースやイオン交換樹脂が用いられる。選択透過膜3をパターン化するには、スピンコート法や滴下法などによって成膜形成することが可能である。スピンコートの場合は、フィルム上のマスクを用いたマスキング法や、レジストを用いたリフトオフなどによってパターン化する。ただし、通常選択透過膜3は、有機溶剤に可溶であるため、レジストには水溶性物質を用いるとよい。

【0040】酵素膜4は、タンパク質、酵素、架橋剤の混合物を含む水溶液をカップリング剤7上に塗布して設ける。タンパク質としてはゼラチン、アルブミン、架橋剤には2感応基アルデヒドであるグルタルアルデヒドを用いるのが一般的である。酵素は、測定対象物質に応じて選定される。例えばグルコースを測定する場合は、グルコース酸化酵素、乳酸を測定する場合は、乳酸酸化酵素などを用いる。

【0041】カップリング剤7は、酵素膜4を基板1に接合させるための接着剤として機能するものであり、各種のシラザンやシランカップリング剤が用いられる。

【0042】制限透過膜5は、基質の侵入量を制限するための膜であり、通常多孔性の膜を用いる。酢酸セルロース、シリコン等、あるいは不織布や多孔性のポリカーボネートフィルムを貼り付けてもよい。

## 5

【0043】本発明の実施形態1のバイオセンサをグルコースセンサとして用いる場合の構成について説明する。

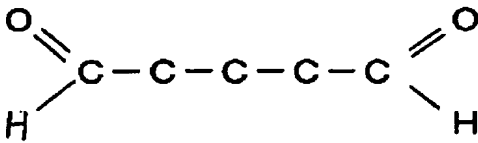
【0044】この場合、電極の材料として作用極2と対極6には、白金を用いる。参照極には、表面が塩化銀に覆われ内部が銀である銀塩化銀電極を用いる。

【0045】選択透過膜3としては、酢酸セルロースを用いる。これは、アスコルビン酸をブロックして測定対象物質である過酸化水素を透過する性質を有するためである。図2に示すように選択透過膜3は、作用極2の表面を完全に覆うため作用極2の表面外形形状より若干大

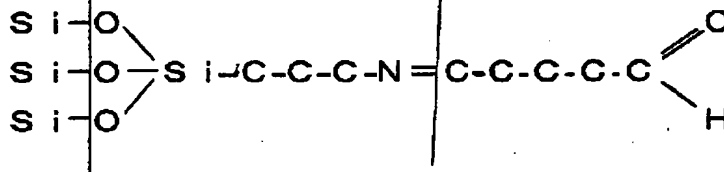


である。なお、分子式では主鎖の炭素に結合する水素を省略している。

【0048】グルタルアルデヒドの分子式は、  
【化2】



ガラス(基板1) APTES(選択透過膜3)



【0050】前述したように、選択透過膜3としての酢酸セルロースと、カップリング剤7としてのγ-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)との間には、上述したような化学結合がないため、選択透過膜3(酢酸セルロース)は、基板1あるいは作用極2との間の付着力が弱い。

【0051】しかしながら、本発明の実施形態1の構成によれば、酵素膜4を基板1の全面に接合して、酵素膜4の締結力を用いて作用極2と選択透過膜3を密着させるため、作用極2と選択透過膜(酢酸セルロース)3との間に剥離が生じることがない。

【0052】また、酵素膜4上には、水溶性シリコンからなる制限透過膜5を設ける。制限透過膜5がない場合は、測定範囲が0~100mg/dlであるが、制限透過膜5がある場合には、測定範囲を0~500mg/dl程度まで拡大することが可能になる。測定範囲は、制限透過膜5の膜厚及び膜質の制御により任意にコントロールされる。膜質の制御は、溶剤と乾燥温度によって

## 6

きめにパターン化する。

【0046】さらに選択透過膜3を含む基板1のほぼ全面にシランカップリング剤7としてのγ-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)を設け、次いで酵素膜4を形成される。酵素膜は牛血清アルブミン(BSA)とグルコース酸化酵素(GOD)の混合物がグルタルアルデヒドと架橋した膜である。

【0047】γ-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)の分子式は、

【化1】

である。なお、分子式では主鎖の炭素に結合する水素を省略している。

【0049】このため、下記に示すように、γ-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)の一方のSiが基板1のガラス分子と結合し、他方のN原子が酵素膜4中のグルタルアルデヒドと結合することとなり、基板1と酵素膜4とは強く密着することとなる。

【化3】

行う。ただし、制限透過膜5は、本発明に必ずしも必要ではない。

【0053】また、図2に示すセンサ素子のリード8は、外部の信号検出回路に接続される。作用極2、対極6、参照極9等からなる感応部10以外の部分は、絶縁膜で覆うか、或いは筐体に収納して溶液と触れないようになっている。これは、リード8、8間に電極反応と無関係な電流が流れないようにするためである。

【0054】次に本発明の実施形態に係るグルコースセンサを用いて、試料溶液中のグルコース濃度を測定する方法について説明する。

【0055】まず、試料溶液中に前述のグルコースセンサを浸漬するか、或いは溶液を感応部10上に滴下する。

【0056】次に、参照極9を基準として、作用極2に一定電位を印加する。この電位は0.6~0.8Vである。

【0057】試料溶液中のグルコース(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)

7

は、酵素膜中の酵素によってグルコン酸 ( $C_6H_{10}O_6$ ) と過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) に変換される。過酸化水素は、白金電極表面に到達すると、作用極 2 に電子を与えて酸化される。前記の電位は、過酸化水素を効率よく酸化するために設定されたものである。

【0058】このとき作用極 2 に流れる電流は、反応した過酸化水素の量に比例する。そして過酸化水素の量は、溶液中のグルコースの量に比例するため、電流値を測定することによって溶液中のグルコース濃度を定量することができる。

【0059】一方、白金電極ではアスコルビン酸も酸化され、酸化電流は測定誤差となる。この影響を取り除くために設けられているのが、選択透過膜 3 の酢酸セルロースである。酢酸セルロース膜 (選択透過膜 3) は、多孔性の高分子膜であり、小さな分子を通し、大きな分子は通さない。すなわち、分子量 34 の過酸化水素を透過し、分子量 176 のアスコルビン酸を透過しないという選択性を有する。このため、試料溶液に含まれるアスコルビン酸は、作用極 2 の表面に到達せず精度の高い測定が可能となる。

【0060】次に、測定中の膜の状態について説明する。前述のように酢酸セルロース (選択透過膜 3) は、シランカップリング剤 7、基板 1、作用極 2 のいずれとも共有結合をもたず、選択透過膜 3 の付着力は、分子の極性に由来する分子間力によって生じている。

【0061】このため、選択透過膜 3 が乾燥状態である場合には、ある程度の密着性を期待できるが、水溶液中では、水の極性によって逆方向も引力が加わるため、選択透過膜 3 の付着力は、ほとんどなくなっている。

【0062】したがって、酢酸セルロースからなる選択透過膜 3 を基板全面に塗布した場合、上層の酵素膜 4 と一体で基板 1 から剥離してしまう。筐体などで膜の周囲を押さえればセンサが破壊することはないが、酵素膜 4 と作用極 2 の間の距離が変動するため、センサ出力が不安定になる。

【0063】しかしながら、本発明の実施形態に係るグ

8

ルコースセンサでは、作用極 2 上に位置する酢酸セルロースの選択透過膜 3 の周囲を酵素膜 4 で強固に押さえ付けているため、酢酸セルロースの選択透過膜 3 が浮き上がることがなく、安定な出力が得られる。

【0064】図 3 は、グルコース濃度  $100\text{mg/dl}$  の標準液を 10 回繰り返し測定したときの結果である。従来のように酢酸セルロース (選択透過膜) を全面に塗布した場合は、出力の変動係数 (標準偏差を平均値で割算したもの) が 0.11 であったが、本発明では 0.018 となり、変動係数が改善されている。

【0065】

【発明の効果】以上説明したように本発明によれば、基板に接合した酵素膜の締結力を用いて作用極と選択透過膜とを密着して安定に保持するため、センサ出力の再現性を得ることができるとともに、安定性に優れたバイオセンサを得ることができ、特に、繰り返し使用した場合、その効果は顕著に現れる。

【0066】さらに選択透過膜は、作用極の表面を完全に覆うため該作用極の表面外形形状より若干大きめにパターン形成されて余白部を有しており、その余白部を利用して作用極の表面及び側面を覆うことにより、作用極の表面を完全に覆うことができ、測定対象の物質を作用極に透過接触させることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の一実施形態を示す断面図である。

【図 2】本発明の一実施形態を示す平面図である。

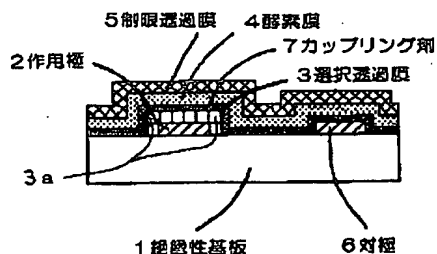
【図 3】繰り返し測定におけるセンサ出力の変動を示す特性図である。

【図 4】従来例を示す断面図である。

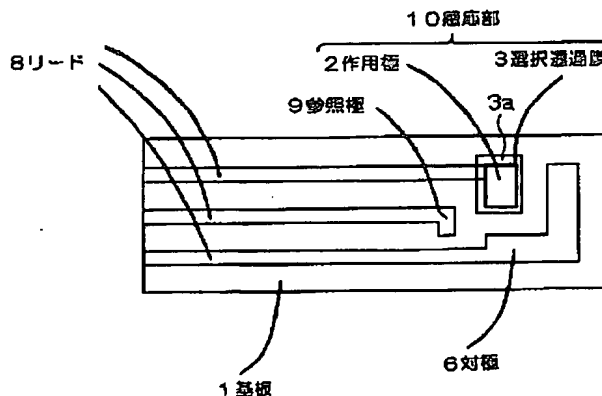
【符号の説明】

- 1 基板
- 2 作用極
- 3 選択透過膜
- 4 酵素膜
- 5 制限透過膜

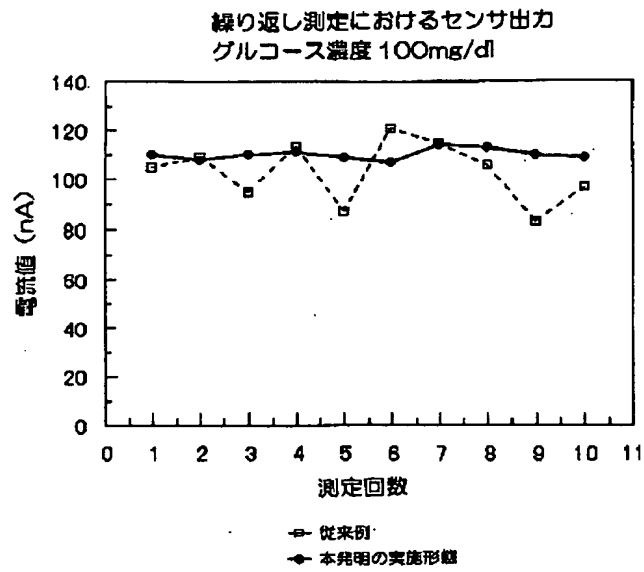
【図 1】



【図 2】



【図3】



【図4】

